

Federal Republic of Germany

Priority Certificate on the Granting
of a Patent Application

File No.: 101 58 411.3
Application date: 29 November 2001
Applicant/proprietor: Ribopharma AG,
Bayreuth/DE
Title: Inhibition of the expression of human MDR1 by means of dsRNA
IPC: C 12 N, A 61 K, A 61 P

The appended documents are a true and exact reproduction of the original documents of this patent application.

Munich, 21 November 2002
German Patent and Trademark Office
The President
On authority
[signature]

Waasmaier

Inhibition of the expression of human MDR1 by means of dsRNA

1. Introduction

The term *multidrug resistance* means a special form of clinical resistance of various tumors to the most diverse chemotherapy agents. This form of resistance is attributed primarily to the activity of an ATP-dependent efflux pump, P-glycoprotein, which is coded for by the MDR1 gene. P-glycoprotein is composed of two transmembranal domains, each consisting of six helices passing through the membrane (Higgins, 1995). In the normal cell, the expression of P-glycoprotein brings about the rapid transport of harmful substances from the cell (Loo & Clarke, 1999).

The MDR phenotype occurs in many tumors during chemotherapy, since MDR1 is greatly overexpressed or even amplified during the course of the therapy. In certain kinds of tumors, the MDR1 level is already high prior to treatment with chemotherapy agents, such as in carcinomas of the pancreas and colon (Robert, 1999). The overexpression of P-glycoprotein means that chemotherapy drugs (cytostatic agents) can no longer halt the growth of the tumor cells, as they are transported out of the cell before they can take effect. The main groups of agents used for cancer therapy that give rise to the MDR phenotype mediated by P-glycoprotein include substances such as anthracyclin antibiotics and plant alkaloids (vinca alkaloids, podophyllotoxins and taxanes) (Stavrovskaya, 1999).

Prospects for suppressing the MDR phenotype thus far involve the use of MDR1 blockers such as verapamil (Tsuruo et al., 1981) or cyclosporin A, but these have substantial side effects in effective concentrations (cardiovascular and neural, myeloid, renal and hepatic toxicity, respectively). For this reason, it is important to develop a more tolerable method – such as the use of dsRNA – to improve the long-term effectiveness of chemotherapy agents in tumors.

2. Procedure

The *in vitro* demonstration of the blocking of the MDR1 expression was carried out in the colon carcinoma cell line LS174T (ATCC – *American Type Culture Collection*; Tom et al., 1976). It is known of this cell line that the expression of MDR1 can be induced by adding rifampicin to the culture medium (Geick et al., 2001). Transfections were carried out with various commercially available transfection kits (Lipofectamine, Oligofectamine, both from Invitrogen; TransMessenger, Qiagen), while the TransMessenger transfection kit proved to be the most suitable for this cell line, since this was able to achieve the clearest results for the decrease in MDR1-specific mRNA in relation to RNA level.

To carry out the RNA interference experiments, 4 short RNA oligonucleotide pairs were used (R1-R4; see Table 1). These consist of double-stranded ribonucleotides, which are complementary to each other and homologous with segments of the coding sequence of MDR1. The sequences R1-R3 consist of a 22-mer *sense* strand and a 24-mer *antisense* strand, the latter having a 2 base projection at its 3' end (0-22-2). The R4 sequence corresponds to R1, but it consists of a 19-mer double strand with a 2 base projection at each 3' end (2-19-2).

Table 1

Name	Sequence	Position in Acc-# AF016535
Seq R1	5' - cca ucu cga aaa gaa guu aag a-3'	1320-1342
	3' -ug. ggu aga gcu uuu cuu caa uuc u-5'	1335-1318
Seq R2	5' - uau agg uuc cag gcu ugc ugu a-3'	2599-2621
	3' -cg aua ucc aag guc cga acg aca u-5'	2621-2597
Seq R3	5' - cca gag aag gcc gca ccu gca u-3'	3778-3799
	3' -uc ggu cuc uuc cgg cgu gga cgu a-5'	3799-3776
Seq R4	5' - cca ucu cga aaa gaa guu aag-3'	1320-1341
	3' -ug ggu aga gcu uuu cuu caa u -5'	1339-1318

Name	Sequence	Position in Acc-# AF402779
Seq K	5' - aca gga uga gga ucg uuu cgc a-3'	2829-2808
	3' -uc ugu ccu acu ccu agc aaa gcg u-5'	2808-2831

These sequences were transfected as ribonucleotide double strands in a concentration of 175 nM each as double batches into the cells, which had been seeded out the day before in 12-well plates at 3.8×10^5 cells per well. For this, 93.3 μ l of EC-R buffer (from the kit) per transfection batch was mixed with 3.2 μ l of Enhancer-R (kit) and then 3.5 μ l of the particular 20 μ M dsRNA was added, mixed well, and incubated for 5 minutes at room temperature. After adding 6 μ l of TransMessenger Transfection Reagent (kit), the transfection batches were vortexed for 10 seconds and incubated for 10 minutes at room temperature. In the meantime, the medium was aspirated from the cells, washed once with PBS (phosphate buffered saline), and 200 μ l of fresh medium without FCS (fetal calf serum) per well was added to the cells. After the 10 minutes of incubation were up, 100 μ l of FCS-free medium was added by pipette to each of the transfection batches, mixed, and the mixture was pipetted by drops to the cells (\Rightarrow total volume of medium for the cells: 400 μ l; the dsRNA concentration of 175 nM is related to this volume). The dsRNA/TransMessenger complex was incubated for 4 hours at 37 degrees C with the cells in FCS-free medium and after this the medium was changed, the fresh medium containing 10 μ M rifampicin and 10% fetal calf serum. As the control, a nonspecific dsRNA sequence against the neomycin resistance gene (K) was used, and also a MOCK transfection was carried out, containing all reagents except dsRNA.

The cells were harvested after 24, 48 and 72 hours and the total RNA was extracted with the RNeasy-Mini-Kit from Qiagen. 10 μ g total RNA of each sample was separated by electrophoresis on a 1% agarose formaldehyde gel, blotted onto a nylon membrane and randomly labeled with 5'- α - 32 P-dCTP, specific probes were hybridized first against MDR1 and, after stripping the blot, against GAPDH as household gene, and exposed on X-ray film.

The X-ray films were stored as bitmap files with the Liscap Capture application software, changed into TIF files via the Photoshop software, and quantified with the Image-Quant software and Microsoft Excel. A comparison was made between the MDR1-specific bands and the corresponding GAPDH bands.

3. Results

Figures 1 and 2 show Northern Blots (A) with quantitative evaluation of the MDR1-specific bands after comparison with the corresponding GAPDH values (B, C). It was possible to observe a reduction in the MDR1-mRNA by up to 55% as compared to the MOCK transfection and by up to 45% as compared to the nonspecific control transfection. The double-stranded R1 sequence proved to be the most interesting for the gene blocking; its almost equivalent R4 sequence (see table) was able to block the expression the least. The transfection efficiency was determined in a separate experiment by means of a Texas-Red labeled DNA oligonucleotide (TexRed-A(GATC)₅T; likewise 175 nM transfected) (Fig. 3) and amounted to around 50% - evaluated on the fluorescent microscope and compared in transmitted light to the total cell count. Thus, it was possible to reduce the expression on the RNA level (45-55%) by around 100% in terms of transfection efficiency, i.e., the MDR1 gene expression was specifically and totally blocked in all cells that were transfected.

4. Literature

Geick, A., Eichelbaum, M., Burk, O. (2001), *JBC* 276 (18), 14581-14587.

Higgins, C.F. (1995) *Cell*, 82, 693-696.

Loo, T.W., and Clarke, D.M. (1999) *Biochem. Cell Biol.* 77, 11-23.

Robert, J. (1999), *Europ J Clin Invest* 29, 536-545.

Stavrovskaya, A.A. (2000) *Biochemistry (Moscow)* 65 (1), 95-106.

Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I., Kahan, B.D. (1976), *In vitro*, 12, 180-191.

Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981), *Cancer Res*, 41, 1967-72.

SEQUENCE PROTOCOL

<110> Ribopharma AG

<120> Inhibition of the expression of human MDR1 by means of dsRNA

<130> Patent for MDR1

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aucucgaa aagaaguuaa ga

22

<210> 2

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ucuuaacuuc uuuucgagau ggg

24

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

uauagguucc aggcugcug ua

22

<210> 4

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

uacagcaagc cuggaaccua uagc

24

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ccagagaagg ccgcaccugc au

22

<210> 6

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

augcaggugc ggccuucucu ggcu

24

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccaucucgaa aagaaguuaa g

21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

aacuucuuu ucgagauggg u

21

<210> 9

<211> 22

<212> RNA

<213> pKSUC1

<400> 9

acaggauagag gaucguuucg ca

22

<210> 10

<211> 24

<212> RNA

<213> pKSUC1

<400> 10

ugcgaaacga uccucauccu gucu

24

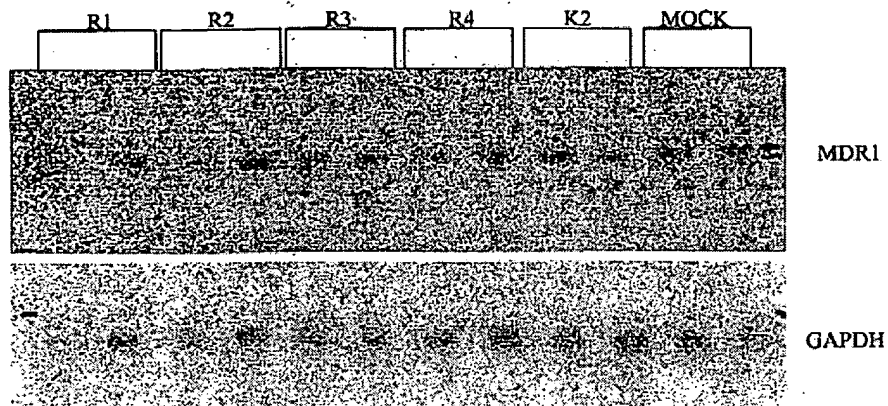
Claims

Protection is requested for the following features individually or in combination:

1. Method for inhibition of the expression of the MDR1 gene in a cell, wherein a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the cell, and one strand of the dsRNA is complementary to one segment of the MDR1 gene.
2. Method per claim 1, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.
3. Method per one of the preceding claims, wherein the complementary region of the dsRNA has 20 to 24, preferably 21 or 22, consecutive pairs of nucleotides.
4. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.
5. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA is smooth at least at one end, preferably at both ends.
6. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA has a projection at least at one end, preferably at both ends.
7. Method per one of the preceding claims, wherein the projection has 1 to 3, preferably 2 bases.
8. Method per one of the preceding claims, wherein the projection is located at the 3' end of the strand of dsRNA complementary to the MDR1 gene.
9. Method per one of the preceding claims, wherein the dsRNA used is one of the sequences Seq. R1, Seq. R2, Seq. R3, or Seq. R4 (see Table 1).
10. Method per one of the preceding claims, wherein the expression is inhibited by the principle of RNA interference.
11. Use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA), one strand of which is complementary to a segment of the MDR1 gene, for inhibition of the expression of the MDR1 gene.
12. Use per claim 11, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.
13. Use per claim 11 or 12, wherein the complementary region of the dsRNA has 20 to 24, preferably 21 or 22, consecutive pairs of nucleotides.
14. Use per one of claims 11 to 13, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.
15. Use per one of claims 11 to 14, wherein the dsRNA is smooth at least at one end, preferably at both ends.
16. Use per one of claims 11 to 15, wherein the dsRNA has a projection at least at one end, preferably at both ends.
17. Use per one of claims 11 to 16, wherein the projection has 1 to 3, preferably 2 bases.
18. Use per one of claims 11 to 17, wherein the projection is located at the 3' end of the strand of dsRNA complementary to the MDR1 gene.

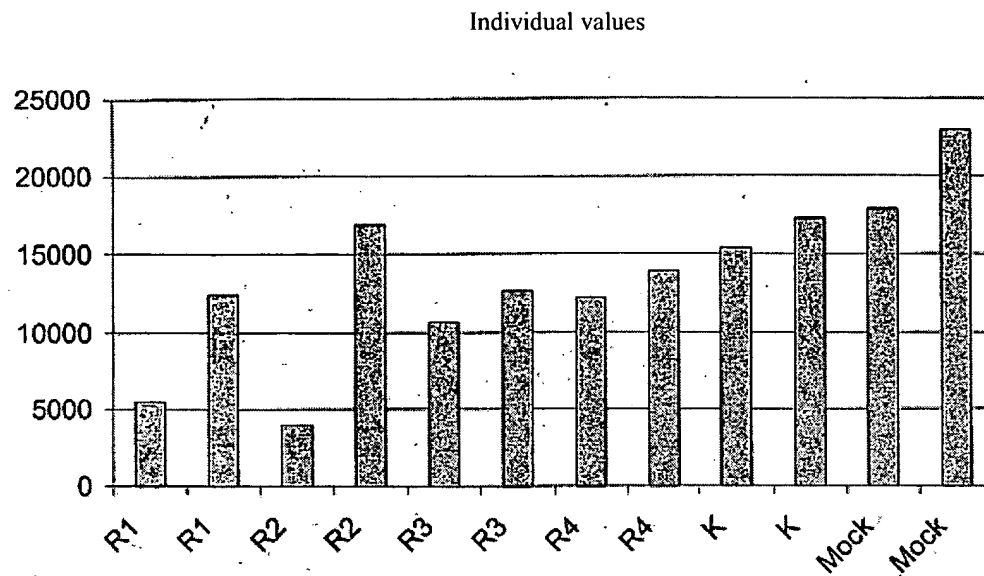
19. Use per one of claims 11 to 18, wherein the dsRNA used is one of the sequences Seq. R1, Seq. R2, Seq. R3, or Seq. R4 (see Table 1).
20. Use per one of claims 11 to 19, wherein the expression is inhibited by the principle of RNA interference.
21. Medicament for inhibition of the expression of the MDR1 gene, containing a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA), wherein one strand of the dsRNA is complementary to a segment of the MDR1 gene.
22. Medicament per claim 21, wherein the complementary region of the dsRNA has fewer than 50, preferably fewer than 25, consecutive pairs of nucleotides.
23. Medicament per claim 21 or 22, wherein the complementary region of the dsRNA has 20 to 24, preferably 21 or 22, consecutive pairs of nucleotides.
24. Medicament per one of claims 21 to 23, wherein the dsRNA is double-stranded in segments.
25. Medicament per one of claims 21 to 24, wherein the dsRNA is smooth at least at one end, preferably at both ends.
26. Medicament per one of claims 21 to 25, wherein the dsRNA has a projection at least at one end, preferably at both ends.
27. Medicament per one of claims 21 to 26, wherein the projection has 1 to 3, preferably 2 bases.
28. Medicament per one of claims 21 to 27, wherein the projection is located at the 3' end of the strand of dsRNA complementary to the MDR1 gene.
29. Medicament per one of claims 21 to 28, wherein the dsRNA used is one of the sequences Seq. R1, Seq. R2, Seq. R3, or Seq. R4 (see Table 1).
30. Medicament per one of claims 21 to 29, wherein the expression is inhibited by the principle of RNA interference.

Fig 1A



Northern Blot assay of a TransMessenger transfection: harvest of the cells after 74 hours; the samples of the double transfections are plotted alongside each other. Hybridization with MDR1 and GAPDH-specific, radioactively labeled probe.

Fig. 1B



Quantification of the bands from Fig. 1A: the GAPDH and MDR1 bands were quantified with the Image-Quant software and compared against the GAPDH values.

Fig. 1C

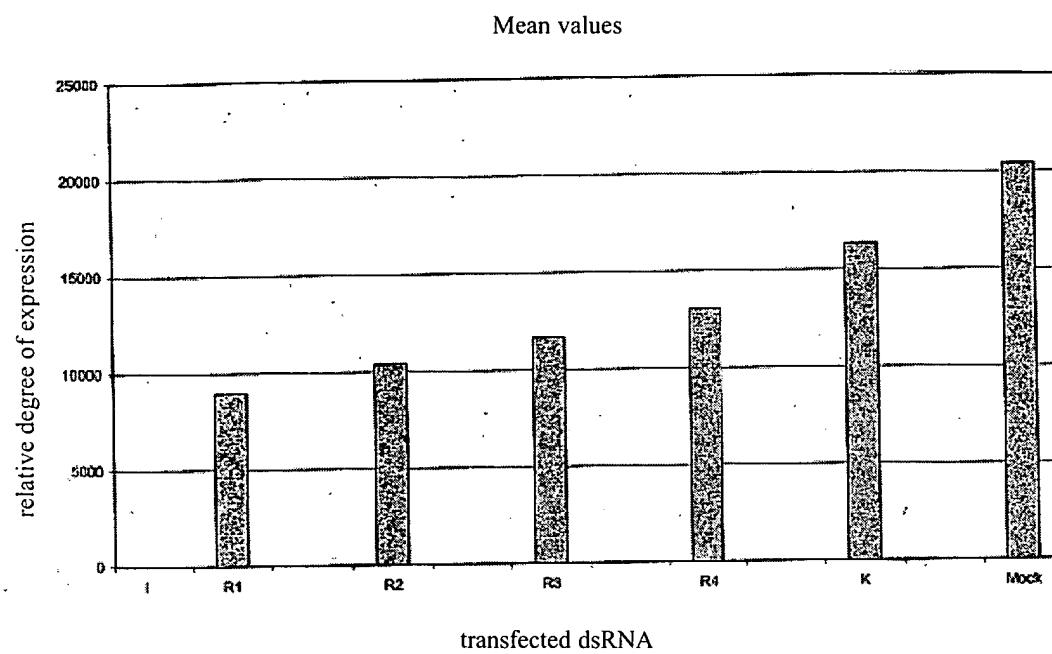
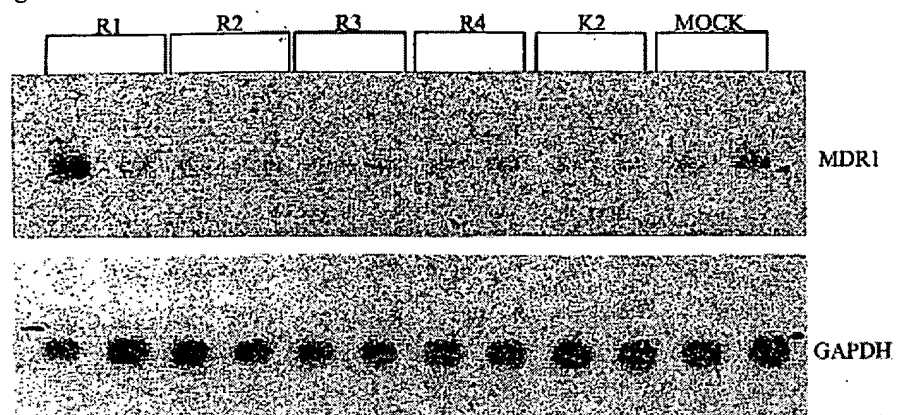
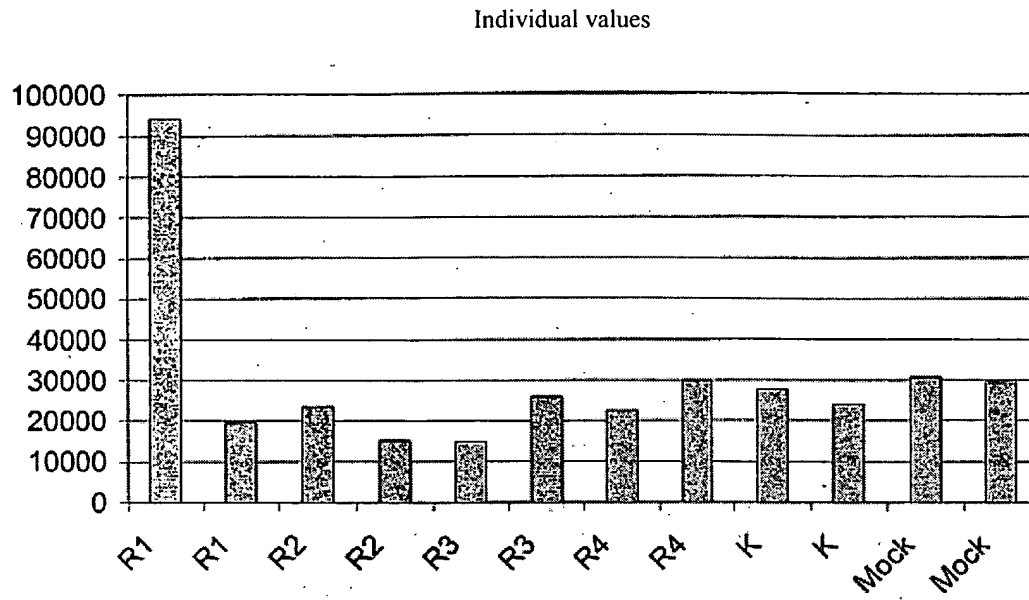


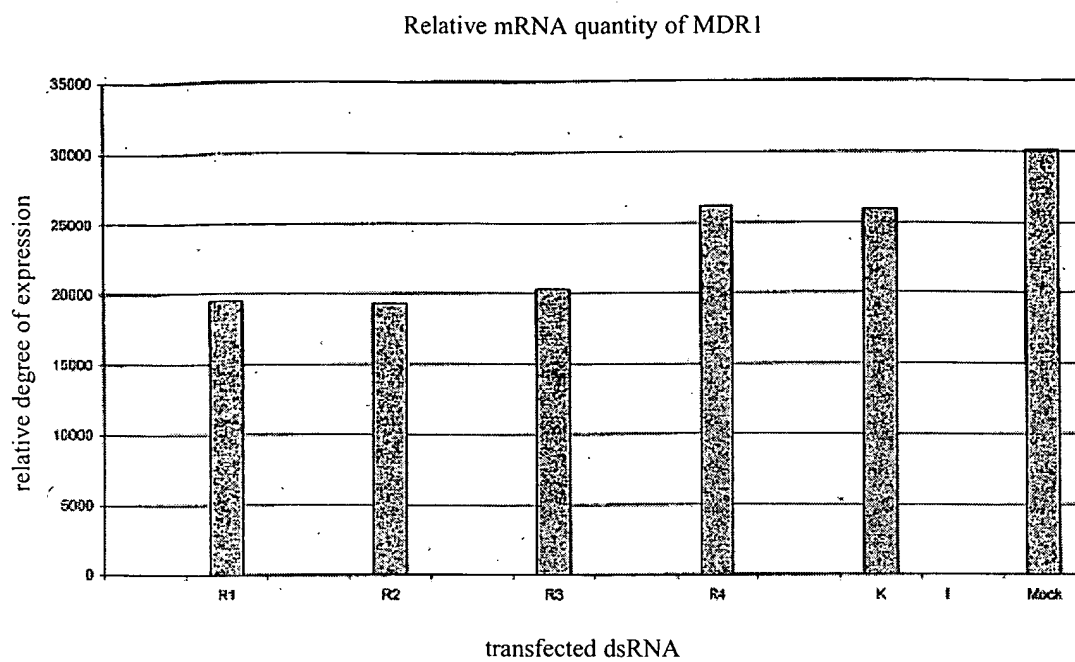
Fig 2A



Northern Blot assay of a TransMessenger transfection: harvest of the cells after 48 hours; the samples of the double transfections are plotted alongside each other. Hybridization with MDR1 and GAPDH-specific, radioactively labeled probe.

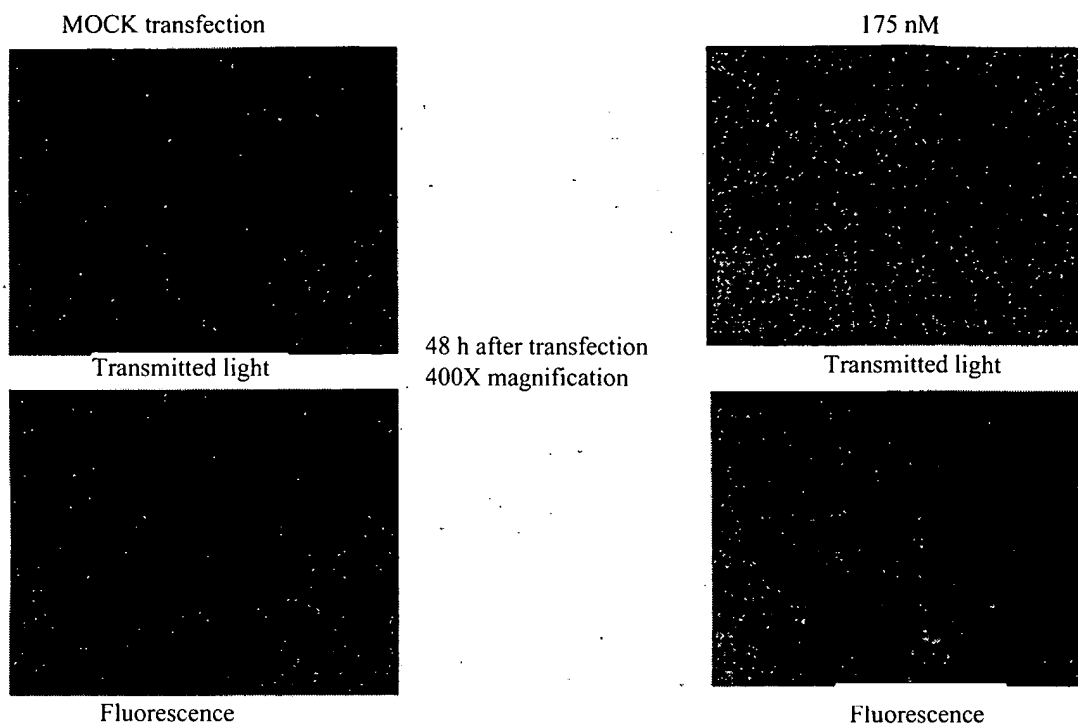


Quantification of the bands from Fig. 2A: the GAPDH and MDR1 bands were quantified with the Image-Quant software and compared against the GAPDH values.

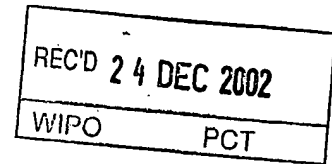


Mean values of the double values shown individually in Fig. 2B, the first R1 value was not included.

Fig. 3



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 58 411.3

Anmeldetag: 29. November 2001

Anmelder/Inhaber: Ribopharma AG,
Bayreuth/DE

Bezeichnung: Hemmung der Expression von humanem MDR1
mittels dsRNA

IPC: C 12 N, A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. November 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wassmaier

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Hemmung der Expression von humanem MDR1 mittels dsRNA

1. Einleitung

Der Begriff *multidrug resistance* bezeichnet eine spezielle Form klinischer Resistenz diverser Tumoren gegenüber verschiedensten Chemotherapeutika. Diese Form der Resistenz wird in erster Linie der Aktivität einer ATP-abhängigen Efflux-Pumpe, P-Glycoprotein, zugeschrieben, welche durch das MDR1-Gen kodiert wird. P-Glycoprotein setzt sich aus zwei transmembranen Domänen zusammen, welche aus je sechs die Membran durchziehenden Helices bestehen (Higgins, 1995). In der normalen Zelle bewirkt die Expression von P-Glycoprotein, den schnellen Transport schädlicher Substanzen aus der Zelle (Loo & Clarke, 1999).

Der MDR-Phänotyp tritt bei zahlreichen Tumoren während der Chemotherapie auf, da MDR1 im Laufe der Therapie stark überexprimiert oder sogar amplifiziert wird. Bei bestimmten Tumorarten ist der MDR1-Level bereits vor der Behandlung mit Chemotherapeutika hoch, wie z. B. bei Karzinomen des Pankreas und Colons (Robert, 1999). Die Überexpression von P-Glycoprotein führt dazu, daß Chemotherapeutika (Zytostatika) das Wachstum der Tumorzellen nicht mehr aufhalten können, da sie vor ihrem Wirksam-Werden aus der Zelle transportiert werden. Zu den Hauptgruppen der zur Krebstherapie eingesetzten Agenzien, welche den durch P-Glycoprotein vermittelten MDR-Phänotyp hervorrufen, gehören Substanzen wie Anthracyclin-Antibiotika und Pflanzen-Alkaloide (Vinca-Alkaloide, Podophyllotoxine und Taxane) (Stavrovskaya, 1999).

Möglichkeiten den MDR-Phänotyp zu unterdrücken, bestehen bisher im Einsatz von MDR1-Blockern wie Verapamil (Tsuruo et al., 1981) oder Cyclosporin A, die aber in wirksamen Konzentrationen erhebliche Nebenwirkungen haben (Cardiovaskuläre, bzw. neurale, myeloide, renale und hepatische Toxizität). Aus diesem Grund ist es wichtig, eine besser verträgliche Methode - wie es der Einsatz von dsRNA sein könnte - zu entwickeln, welche die Wirksamkeit von Chemotherapeutika in Tumoren dauerhaft verbessert.

2. Durchführung

Der *in vitro* Nachweis für das Blockieren der MDR1-Expression wurde in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T (ATCC – *American Type Culture Collection*; Tom et al., 1976) durchgeführt. Von dieser Zelllinie ist bekannt, daß die Expression von MDR1 durch Zugabe von Rifampicin zum Kulturmedium induzierbar ist (Geick et al., 2001). Transfektionen wurden mit verschiedenen käuflichen Transfektions-Kits (Lipofectamine, Oligofectamine, beide Invitrogen; TransMessenger, Qiagen) durchgeführt, wobei der TransMessenger Transfektions-Kit sich als für diese Zelllinie am geeignetsten herausstellte, da mit diesem die deutlichsten Ergebnisse auf RNA-Ebene bezogen auf die Abnahme an MDR1-spezifischer mRNA erzielt werden konnte.

Zur Durchführung der RNA-Interferenz-Experimente wurden 4 kurze RNA-Oligonukleotid-Paare (R1-R4; siehe Tabelle 1) eingesetzt. Diese bestehen aus doppelsträngigen Ribonukleotiden, welche zueinander komplementär und mit Abschnitten der kodierenden Sequenz von MDR1 homolog sind. Die Sequenzen R1 – R3 bestehen aus einem 22-mer *sense*- und einem 24-mer *antisense*-Strang, wobei letzterer an seinem 3'-Ende 2 Basen Überhang aufweist (0-22-2). Die Sequenz R4 entspricht R1, jedoch besteht sie aus einem 19-mer Doppelstrang mit je zwei Basen Überhang an jedem 3'-Ende (2-19-2).

Tab. 1

Name	Sequenz	Position in Acc-# AF016535
Seq R1	5' - cca ucu cga aaa gaa guu aag a-3' 3' -ug ggu aga gcu uuu cuu caa uuc u-5'	1320-1342 1335-1318
Seq R2	5' - uau agg uuc cag gcu ugc ugu a-3' 3' -cg aua ucc aag guc cga acg aca u-5'	2599-2621 2621-2597
Seq R3	5' - cca gag aag gcc gca ccu gca u-3' 3' -uc ggu cuc uuc cgg cgu gga cgu a-5'	3778-3799 3799-3776
Seq R4	5' - cca ucu cga aaa gaa guu aag-3' 3' -ug ggu aga gcu uuu cuu caa u -5'	1320-1341 1339-1318

Name	Sequenz	Position in Acc-# AF402779
Seq K	5' - aca gga uga gga ugc uuu cgc a-3' 3' -uc ugu ccu acu ccu agc aaa gcg u-5'	2829-2808 2808-2831

Hemmung der Expression von Multidrug resistance Gen 1 (MDR1) durch dsRNA

Diese Sequenzen wurden als Ribonukleotid-Doppelstränge in einer Konzentration von 175 nM jeweils als doppelte Ansätze, in die Zellen transfiziert, welche am Tag zuvor in 12-Loch-Platten à $3,8 \times 10^5$ Zellen / Vertiefung ausgesät wurden. Dazu wurden pro Transfektionsansatz 93,3 µl EC-R-Puffer (aus dem Kit) mit 3,2 µl Enhancer-R (Kit) vermengt und danach 3,5 µl der jeweiligen 20 µM dsRNA zugegeben, gut gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 6 µl TransMessenger Transfection Reagent (Kit) wurden die Transfektionsansätze 10 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, einmal mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen und 200 µl frisches Medium ohne FKS (fötales Kälberserum) pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der 10-minütigen Inkubationszeit wurden je 100 µl FKS-freies Medium zu den Transfektionsansätzen pipettiert, gemischt, und die Mischung tropfenweise zu den Zellen pipettiert (\Rightarrow Gesamtvolumen des Mediums auf den Zellen: 400 µl; auf dieses Volumen bezieht sich die dsRNA-Konzentration von 175 nM). Die dsRNA / TransMessenger-Komplexe wurden 4 Stunden bei 37°C mit den Zellen in FKS-freiem Medium inkubiert und danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das frische Medium 10 µM Rifampicin und 10% fötales Kälberserum enthielt. Als Kontrolle wurde eine unspezifische dsRNA-Sequenzen gegen das Neomycin-Resistenzgen eingesetzt (K), als auch eine MOCK-Transfektion durchgeführt, welche alle Reagenzien enthielt, bis auf dsRNA.

Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet und die Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen extrahiert. 10 µg Gesamt-RNA jeder Probe wurden auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran geblotet und mit 5'- $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP random-markierten, spezifischen Sonden zuerst gegen MDR1 und nach dem Strippen des Blots gegen GAPDH als Haushaltsgen hybridisiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

Die Röntgenfilme wurden als Bitmap-Dateien mit der Liscap-Capture-Application Software abgespeichert, über die Photoshop-Software in TIF-Dateien umgewandelt und mit der Image-Quant-Software und Microsoft Excel quantifiziert. Dabei wurde ein Abgleich der MDR1-spezifischen Banden mit den entsprechenden GAPDH-Banden durchgeführt.

3. Ergebnisse

Abbildungen 1 und 2 zeigen Northern-Blots (A) mit quantitativer Auswertung der MDR1-spezifischen Banden nach Abgleich mit den entsprechenden GAPDH-Werten (B, C). Es konnte eine Reduktion der MDR1-mRNA um bis zu 55 % im Vergleich zur MOCK-Transfektion und um bis zu 45 % im Vergleich zur unspezifischen Kontroll-Transfektion beobachtet werden. Die doppelsträngige R1-Sequenz erwies sich als am wirksamsten für die Genblockierung; die ihr nahezu entsprechende R4-Sequenz (siehe Tabelle) vermochte die Expression am wenigsten zu blockieren. Die Transfektionseffizienz wurde in einem getrennten Experiment mit Hilfe eines Texas-Red-markierten DNA-Oligonukleotids (TexRed-A(GATC)₅T; ebenfalls 175 nM transfiziert) ermittelt (Abb. 3) und betrug – am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und im Durchlicht mit der Gesamtzellzahl verglichen – etwa 50%. Somit konnte die Expression auf RNA-Ebene (45-55%) bezogen auf die Transfektionseffizienz (ca. 50%) um ca. 100% reduziert werden, d.h., in allen Zellen, welche transfiziert wurden, wurde die MDR1-Genexpression spezifisch und vollständig blockiert.

4. Literatur

- Geick, A., Eichelbaum, M., Burk, O. (2001), *JBC* 276 (18), 14581-14587.
Higgins, C.F. (1995) *Cell*, 82, 693-696.
Loo, T.W., and Clarke, D.M. (1999) *Biochem. Cell Biol.* 77, 11-23.
Robert, J. (1999), *Europ J Clin Invest* 29, 536-545.
Stavrovskaya, A.A. (2000) *Biochemistry (Moscow)* 65 (1), 95-106.
Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I., Kahan, B.D. (1976), *In vitro*, 12, 180-191.
Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981), *Cancer Res*, 41, 1967-72.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ribopharma AG

<120> Hemmung der Expression von humanem MDR1 mittels dsRNA

<130> Patent für MDR1

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aucucgaa aagaaguuaa ga

22

<210> 2

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ucuaacuuc uuuucgagau ggg

24

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

uauagguucc aggcugcug ua

22

<210> 4

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

uacagcaagc cuggaaccua uagc

24

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ccagagaagg ccgcaccugc au

22

<210> 6

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6
augcaggugc ggccuucucu ggcu

24

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
ccaucucgaa aagaaguuaa g

21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
aaacuucuu ucgagauggg u

21

<210> 9
<211> 22
<212> RNA
<213> pKSUC1

<400> 9
acaggaugag gaucguuucg ca

22

<210> 10
<211> 24
<212> RNA
<213> pKSUC1

<400> 10
ugcgaaacga uccucauccu gucu

24

Anspruchskomplex

Es wird Schutz für die folgenden Merkmale einzeln oder in beliebiger Kombination beansprucht:

5

1. Verfahren zur Hemmung der Expression des MDR1-Gens in einer Zelle, wobei eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang der dsRNA komplementär zu einem Abschnitt des MDR1-Gens ist.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

15 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 20 bis 24, vorzugsweise 21 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

20 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende, vorzugsweise beide Enden, der dsRNA glatt ausgebildet ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende, vorzugsweise beide Enden, der dsRNA einen Überhang aufweist.

30

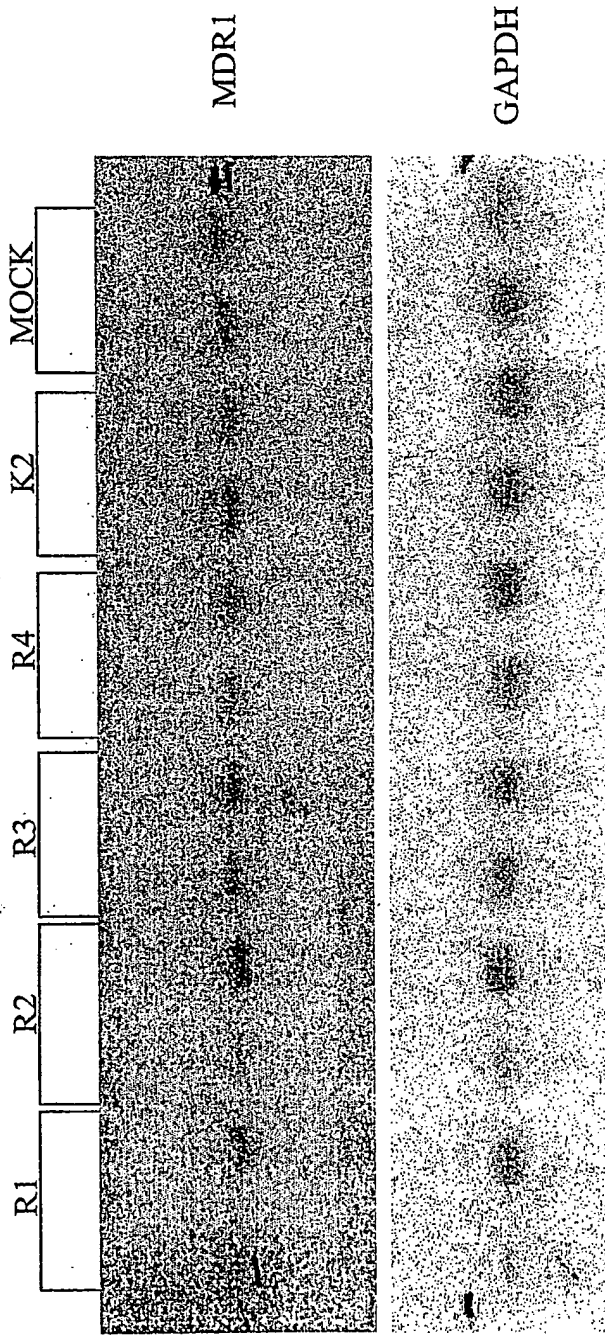
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang 1 bis 3, vorzugsweise 2, Basen aufweist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei sich der Überhang am 3'-Ende des zum MDR1-Gen komplementären Strangs der dsRNA befindet.
- 5 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als dsRNA eine der Sequenzen Seq. R1, Seq. R2, Seq. R3 oder Seq. R4 (siehe Tab.1) verwendet wird.
- 10 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.
- 15 11. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA), deren einer Strang komplementär zu einem Abschnitt des MDR1-Gens ist, zur Hemmung der Expression des MDR1-Gens.
- 20 12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
- 25 13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 20 bis 24, vorzugsweise 21 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 30 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei zumindest ein Ende, vorzugsweise beide Enden, der dsRNA glatt ausgebildet ist.

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 15, wobei zumindest ein Ende, vorzugsweise beide Enden, der dsRNA einen Überhang aufweist.
- 5 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 16, wobei der Überhang 1 bis 3, vorzugsweise 2, Basen aufweist.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 17, wobei sich der Überhang am 3'-Ende des zum MDR1-Gen komplementären Strangs der dsRNA befindet.
- 10 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 18, wobei als dsRNA eine der Sequenzen Seq. R1, Seq. R2, Seq. R3 oder Seq. R4 (siehe Tab.1) verwendet wird.
- 15 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 bis 19, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.
- 20 21. Medikament zur Hemmung der Expression des MDR1-Gens, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), wobei ein Strang der dsRNA komplementär zu einem Abschnitt des MDR1-Gens ist.
- 25 22. Medikament nach Anspruch 21, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA weniger als 50, vorzugsweise weniger als 25, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
- 30 23. Medikament nach einem der Ansprüche 21 oder 22, wobei der komplementäre Bereich der dsRNA 20 bis 24, vorzugsweise 21 oder 22, aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

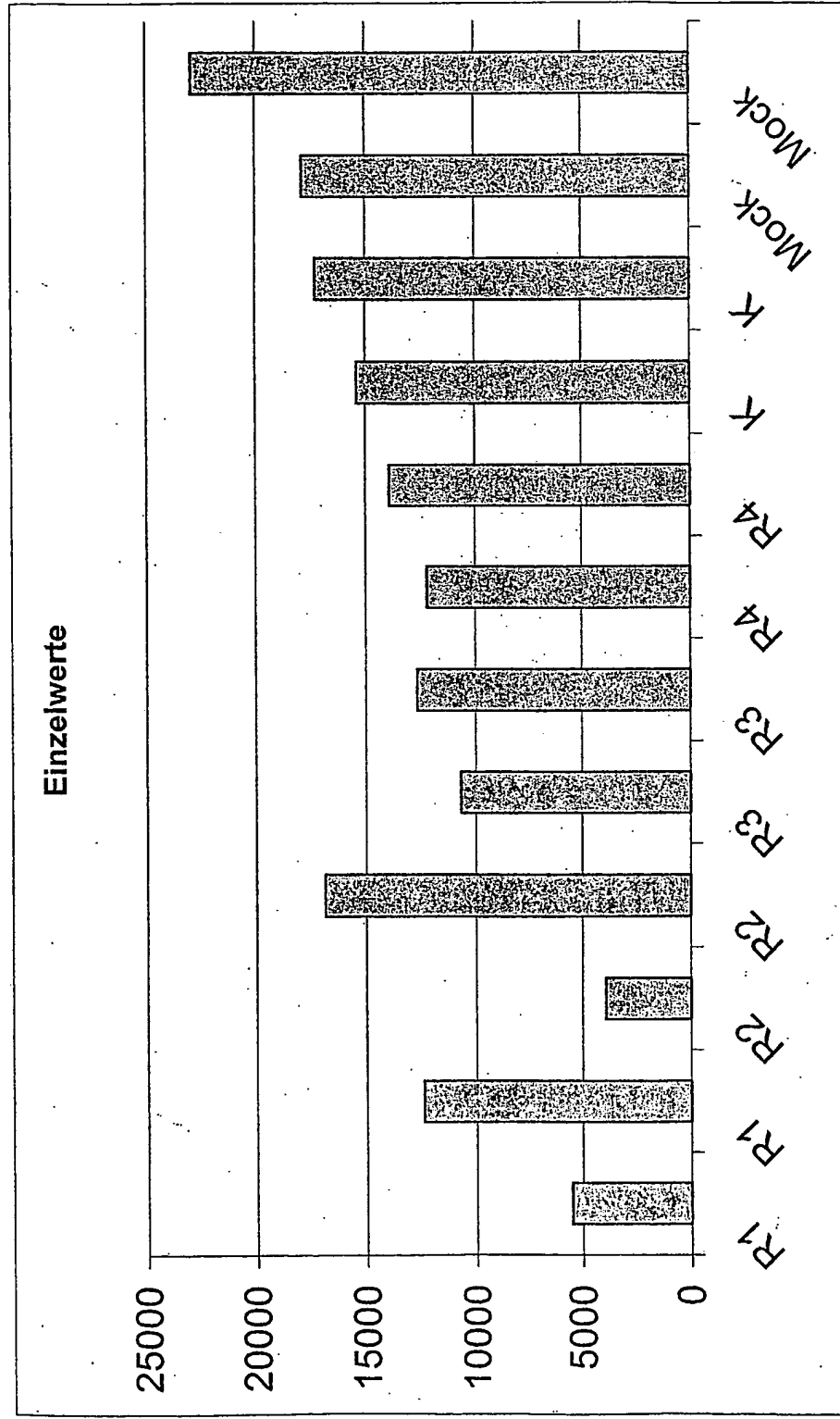
24. Medikament nach einem der Ansprüche 21 bis 23, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 5 25. Medikament nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei zumindest ein Ende, vorzugsweise beide Enden, der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 10 26. Medikament nach einem der Ansprüche 21 bis 25, wobei zumindest ein Ende, vorzugsweise beide Enden, der dsRNA einen Überhang aufweist.
27. Medikament nach einem der Ansprüche 21 bis 26, wobei der Überhang 1 bis 3, vorzugsweise 2, Basen aufweist.
- 15 28. Medikament nach einem der Ansprüche 21 bis 27, wobei sich der Überhang am 3'-Ende des zum MDR1-Gen komplementären Strangs der dsRNA befindet.
- 20 29. Medikament nach einem der Ansprüche 21 bis 28, wobei als dsRNA eine der Sequenzen Seq. R1, Seq. R2, Seq. R3 oder Seq. R4 (siehe Tab.1) verwendet wird.
- 25 30. Medikament nach einem der Ansprüche 21 bis 29, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

Abb. 1A



Northern-Blot-Analyse einer TransMessenger-Transfektion: Ernte der Zellen nach 74 Stunden; die Proben der Doppeltransfektionen sind nebeneinander aufgetragen Hybridisierung mit MDR1- bzw. GAPDH-spezifischer, radioaktiv markierter Sonde.

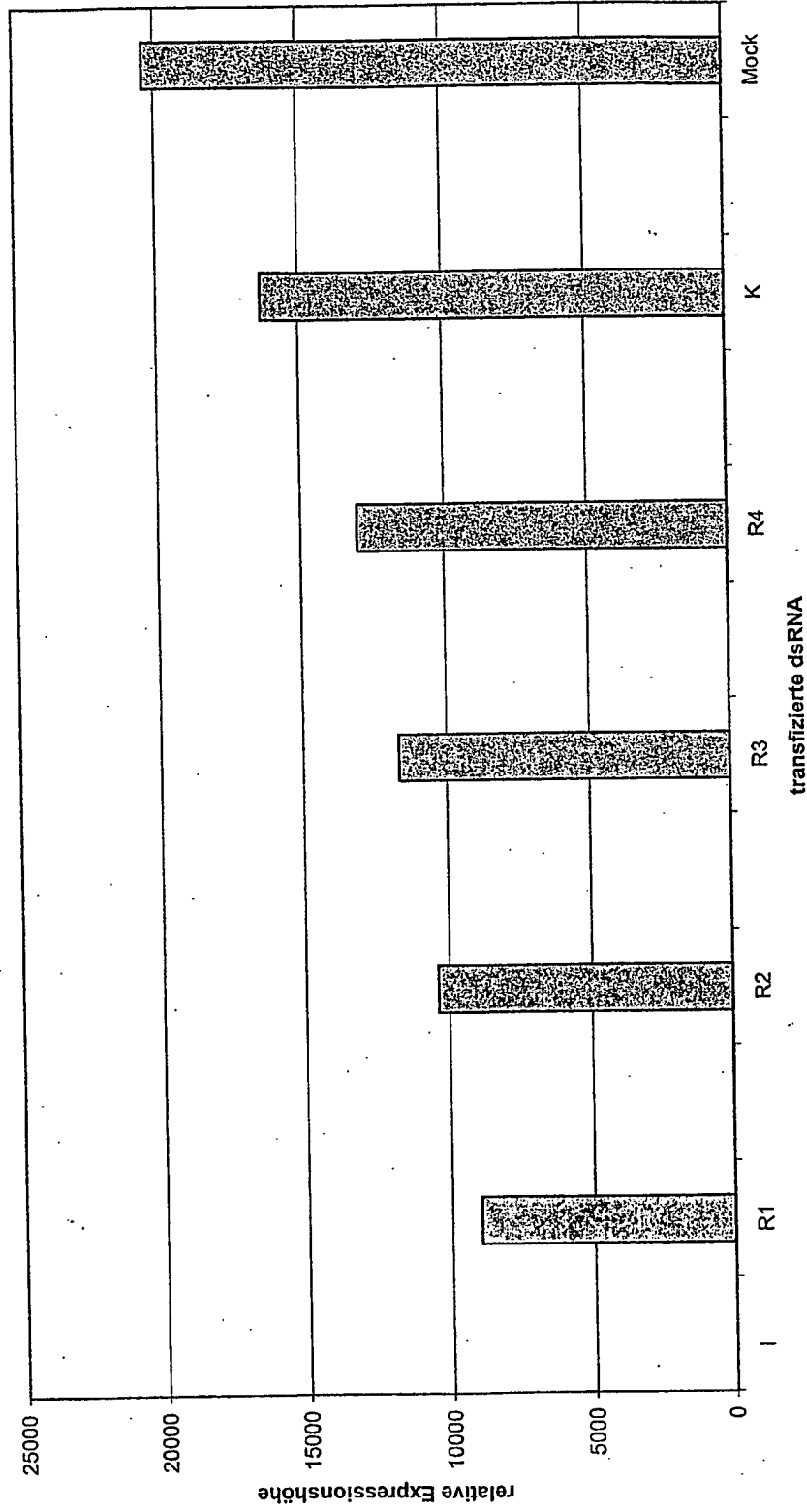
Abb. 1B



Quantifizierung der Banden aus Abb. 1A: Die GAPDH- und MDR1-Banden wurden mit der Image-Quant-Software quantifiziert und gegen die GAPDH-Werte abgeglichen.

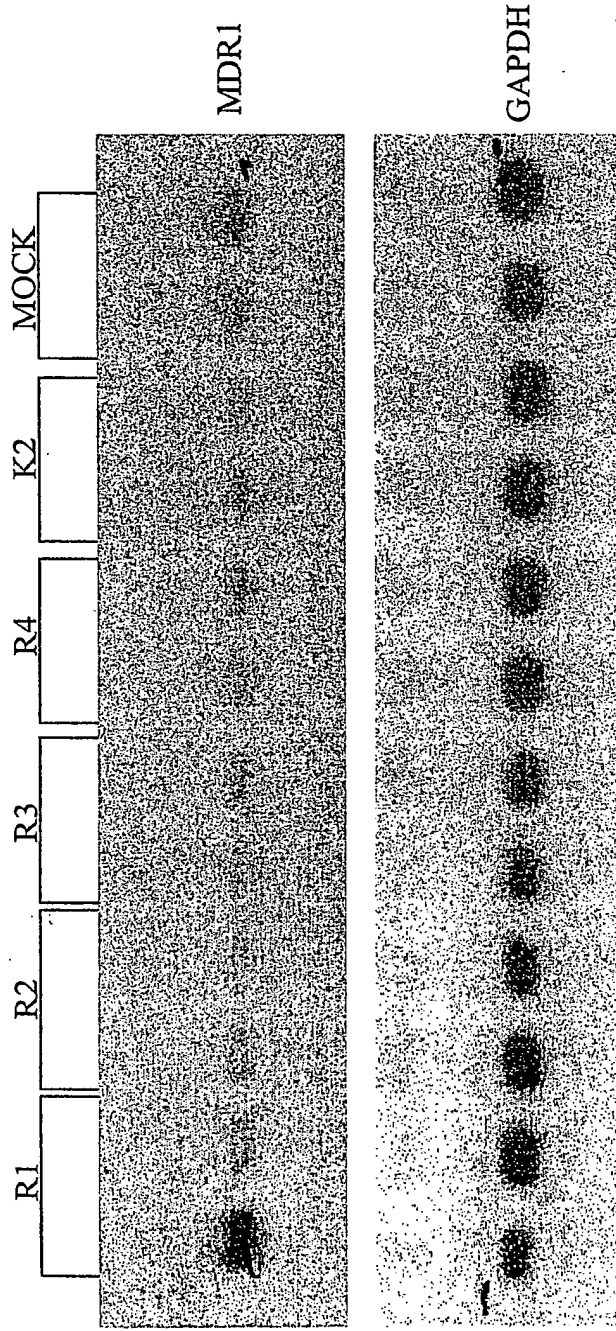
Abb. 1C

Mittelwerte

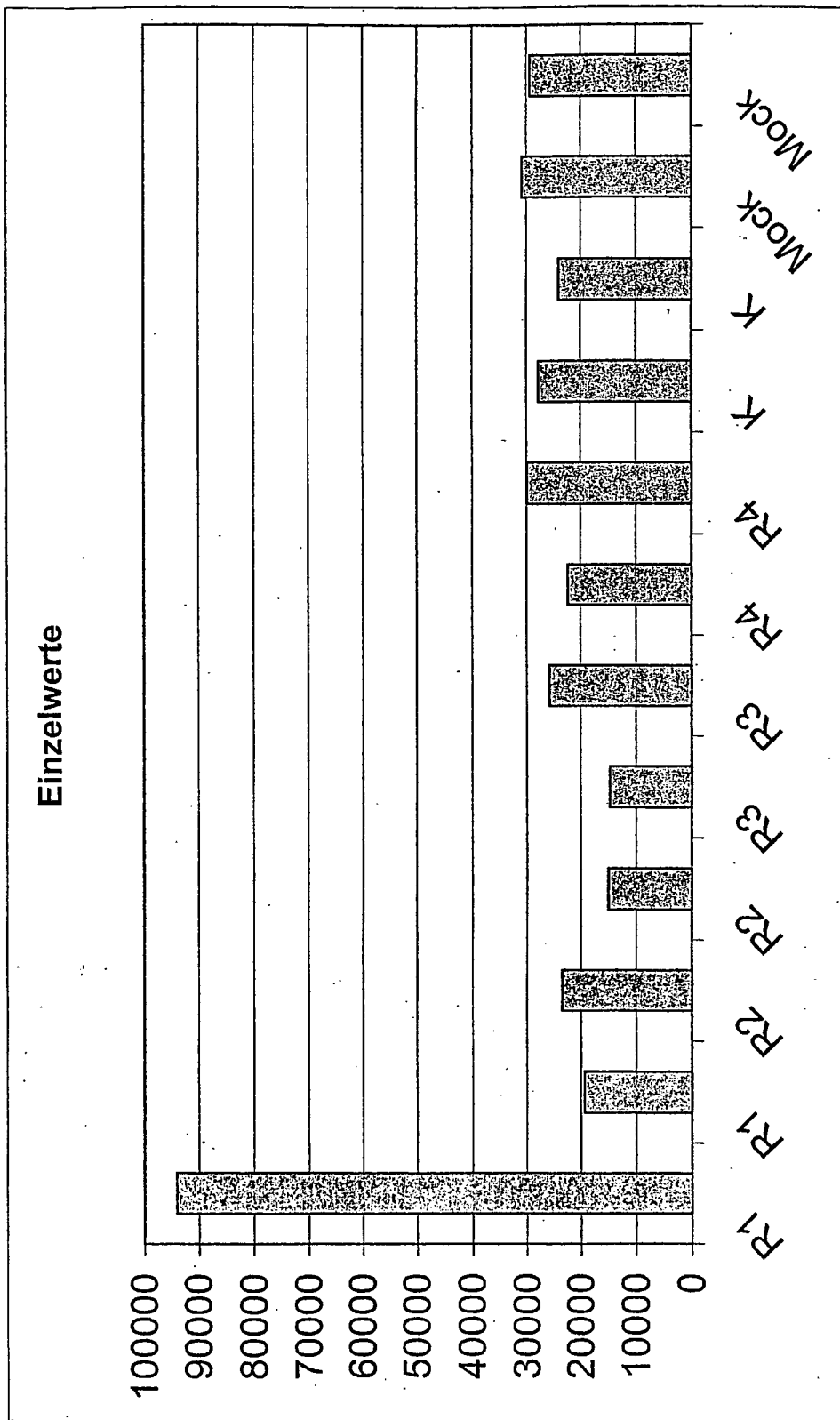


Mittelwerte der in Abb. 1B einzeln dargestellten Doppelwerte.

Abb. 2A

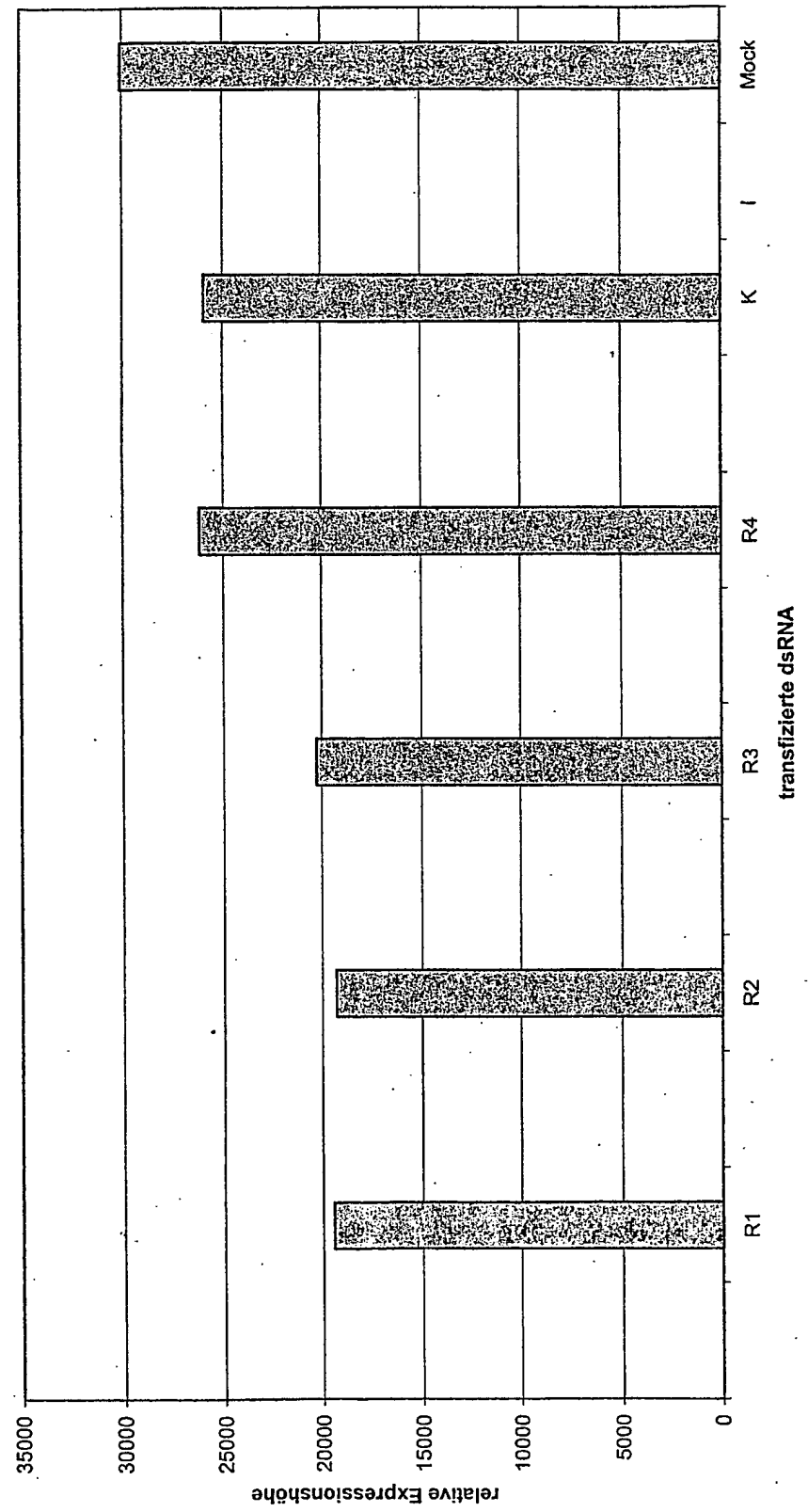


Northern-Blot-Analyse einer TransMessenger-Transfektion: Ernte der Zellen nach 48 Stunden; die Proben der Doppeltransfektionen sind nebeneinander aufgetragen Hybridisierung mit MDR1- bzw. GAPDH-spezifischer, radioaktiv markierter Sonde.



Quantifizierung der Banden aus Abb. 2A: Die GAPDH- und MDR1-Banden wurden mit der Image-Qant-Software quantifiziert und gegen die GAPDH-Werte abgeglichen.

Relative mRNA-Menge MDR1



Mittelwerte der in Abb. 2B einzeln dargestellten Doppelwerte, der erste R1-Wert wurde nicht mit einbezogen.

Abb. 3 MOCK-Transfektion

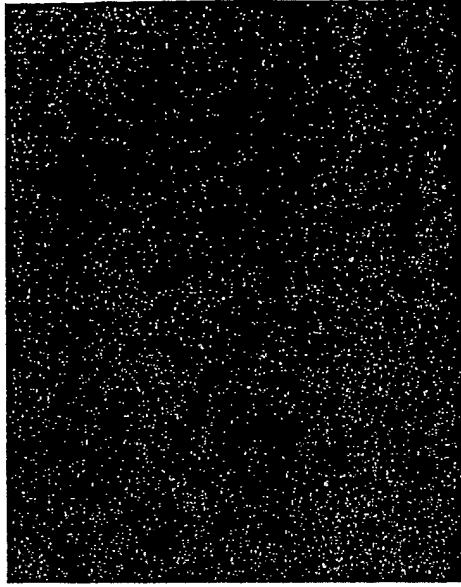


Durchlicht



Fluoreszenz

175 nm



Durchlicht



Fluoreszenz

48h nach Transfektion,
 400-fache Vergrößerung